

## Dosadašnja postignuća na promeni boje cvetova biljaka metaboličkom modulacijom biosinteze karotenoida

**Milena Trajković, Sladjana Jevremović, Aleksandar Cingel**

Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković" – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu, Bulevar despota Stefana 142, 11060 Beograd

Kontakt: [sladja@ibiss.bg.ac.rs](mailto:sladja@ibiss.bg.ac.rs)

### Apstrakt

U hortikulturi je prisutna stalna potreba za ukrasnim biljkama sa novim karakteristikama, gde boja cveta predstavlja jednu od najvažnijih osobina koja određuje njihovu komercijalnu vrednost. Sa razvojem metoda genetičkog inženjeringa otvorena je mogućnost kreiranja biljaka sa željenom bojom cvetova koja se ne može postići klasičnim ukrštanjem ili mutagenезom. Boja cvetova kod biljaka određena je sadržajem tri biljna pigmenta: antocijanina, karotenoida i betalaina. Do sada, najveći napredak postignut je genetičkom modulacijom biosinteze antocijanina. Na ovaj način postignute su nove boje cvetova kod najmanje 50 ukrasnih vrsta, a neki od tih modifikovanih varijeteta su već dugi niz godina u slobodnoj prodaji. Međutim, promena boje cveta manipulacijom biosintetskog puta karotenoida je dokumentovana kod svega nekoliko ukrasnih vrsta i poslednjih godina intenzivirana su istraživanja u tom pravcu. U ovom radu je razmatran potencijal ovog pristupa, sa posebnim osvrtom na rezultate postignute na promeni boje cvetova kod kultivara ljubičice uvodjenjem gena za kapsantin-kapsorubin sintazu.

**Ključne reči:** Genetičke transformacije, *crt* geni, *ccs*, *Viola cornuta*.

## Recent advances in flower color alteration by metabolic manipulation of carotenoid biosynthesis

**Milena Trajković, Sladjana Jevremović, Aleksandar Cingel**

Institute for Biological Research „Siniša Stanković” – National Institute of the Republic of Serbia,  
University of Belgrade, Despot Stefan Boulevard, 11060 Belgrade

Correspondence: [sladjja@ibiss.bg.ac.rs](mailto:sladjja@ibiss.bg.ac.rs)

### Abstract

In horticulture, there is a constant need for ornamental plants with new characteristics, where the flower color is one of the most important features that determines their commercial value. With the development of genetic engineering methods, it has been possible to create plants with the desired flower color which cannot be achieved by classical breeding or mutagenesis. The flower color in plants is determined by the content of three plant pigments: anthocyanins, carotenoids and betalains. Up to date, the greatest progress has been made by genetic modulation of anthocyanin biosynthesis. In this way, the new flower colors have been achieved in at least 50 ornamental species, and some of these modified varieties have been on market for many years. However, the alteration of flower color by manipulating the carotenoid biosynthetic pathway has been documented in only a few ornamental species, and the research has been significantly increased last few years. In this paper, the potential of this approach is considered, with special reference to the results achieved on flower color alteration of pansy cultivars by introducing the gene for capsanthin-capsorubin synthase.

**Keywords:** Genetic transformations, *crt* genes, *ccs*, *Viola cornuta*.

## UVOD

Boja cveta predstavlja jednu od najvažnijih osobina ukrasnih biljaka i za to su odgovorni biljni pigmenti: antocijanini, karotenoidi i betalaini. Antocijanini su najrasprostranjeniji u prirodi i cvetovima daju širok spektar boja, počev od plave, pa do žute i crvene. Karotenoidi su zaslužni za žutu, narandžastu i crvenu boju cvetova, dok betalaini, koji su otkriveni samo kod vrsta iz reda *Caryophyllales*, daju različite nijanse ljubičaste, svetlo smeđe, žute, narandžaste i crvene boje [1].

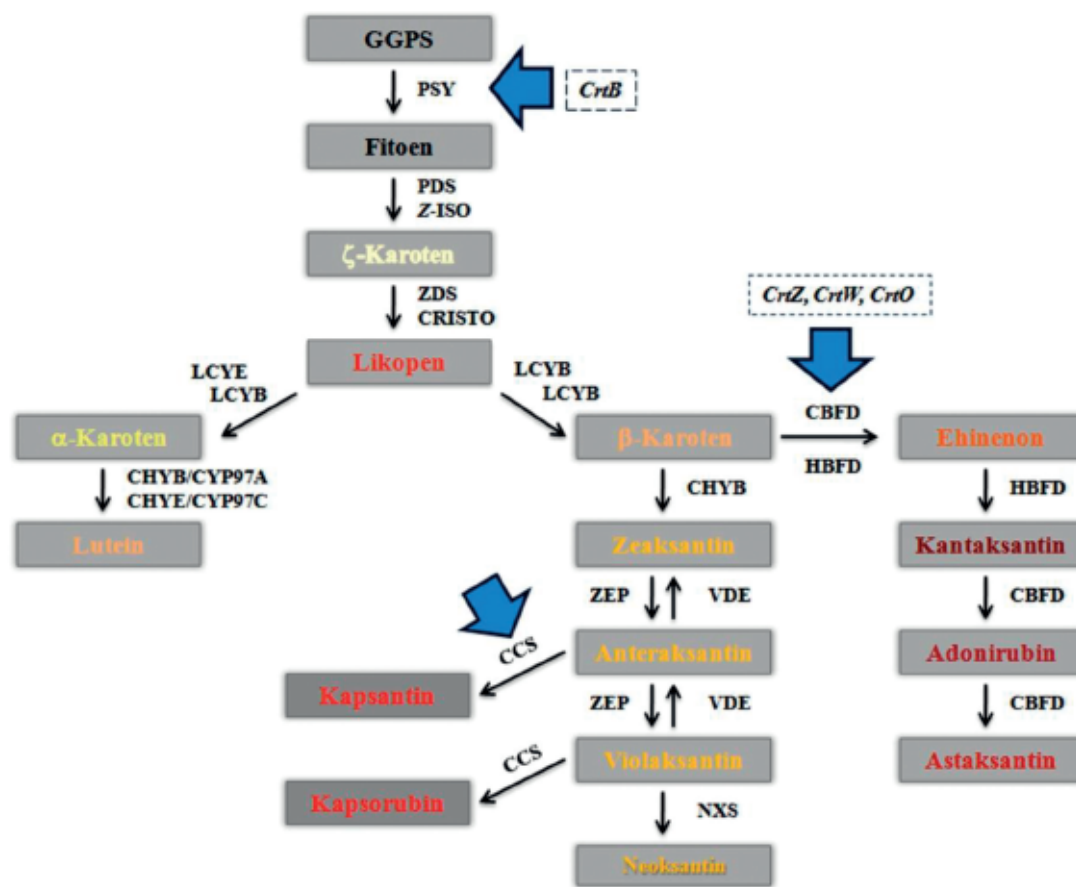
Biljni karotenoidi su po strukturi lipofilni C40 izoprenoidi sa polienskim lancima koji sadrže prstenove na svojim krajevima i konjugovane dvostruke veze zahvaljujući kojima apsorbuju vidljivu svetlost [2]. U biljkama se nalaze i u fotosintetičkim i u nefotosintetičkim tkivima. U fotosintetičkim tkivima, odnosno listovima biljaka, karotenoidi su smešteni u hloroplastima gde imaju brojne funkcije neophodne za proces fotosinteze, kao što su izgradnja fotosistema, apsorpcija svetlosti i zaštita fotosintetičkog aparata od fotooksidacije [3]. U nefotosintetičkim tkivima, plodovima i cvetovima, njihova uloga je prvenstveno u obezbeđivanju obojenosti kojom će privući oprašivače i životinje koje se hrane plodovima, kako bi došlo do širenja semena u cilju reprodukcije biljaka [4,5]. Pored toga, od karotenoida mogu nastati isparljivi apokarotenoidi koji, kao važna komponenta mirisa cvetova ili arome plodova, pospešuju interakcije između biljaka i životinja. Karotenoidi služe i kao prekursori za sintezu dve grupe fitohormona, abscisinske kiseline (ABA) i strigolaktona, koji imaju ključnu ulogu u razviću biljke i njenom odgovoru na stres [6,7]. U ljudskoj ishrani obezbeđuju prekursore za biosintezu vitamina A, a zbog svoje snažne antioksidativne aktivnosti koriste se i u cilju zaštite od raznih hroničnih oboljenja kao što su kancer, kardiovaskularne bolesti i bolesti oka [8,9].

U cvetovima i plodovima biljaka karotenoidi se sintetišu *de novo* u hromoplastima, fotosintetički neaktivnim plastidima [10], gde se akumuliraju u lipoproteinskim partikulama, odnosno plastoglobulama, ali i u strukturama kao što su fibrili, membrane, kristali i tubule. Smatra se da se tokom sazrevanja plodova, kao i razvića cvetova, hromoplasti mogu diferencirati od bilo kog tipa plastida, nefotosintetičkih ili fotosintetičkih, u zavisnosti od tkiva u kojima se nalaze. Tako, na primer, u pojedinim delovima cveta hromoplasti nastaju od amiloplasta, gde je konverzija plastida praćena razgradnjom skroba i proizvodnjom šećernog nektara [11], dok prilikom diferencijacije hromoplasta od hloroplasta dolazi do potpune degradacije hlorofila, dezintegracije tilakoida i reorganiziranja membranskog sistema plastida, pri čemu se formiraju strukture u kojima će se potom akumulirati karotenoidi [12].

### Biosinteza karotenoida

U poslednje dve decenije svi geni glavnog biosintetskog puta karotenoida su identifikovani, klonirani i funkcionalno okarakterisani [8, 13-16], Slika 1.

Biosinteza karotenoida započinje kondenzacijom dva molekula geranilgeranil-difosfata (GGPP) pomoću enzima fitoen-sintaze (PSY) pri čemu nastaje bezbojni fitoen (C40). Slede reakcije desaturacije pomoću enzima fitoen-desaturaze (PDS) i ζ-karoten-desaturaze (ZDS), kao i reakcije izomerizacije pomoću enzima ζ-karoten-izomeraze (Z-ISO) i karotenoid-izomeraze (CRTISO), nakon čega dolazi do formiranja crvenog *all-trans* likopena, prvog obojenog karotenoida [17]. U biosintetskom putu karotenoida likopen predstavlja tačku grananja i supstrat za dva kompetitivna enzima, likopen-β-ciklazu (LCYB) i likopen-ε-ciklazu (LCYE). Oba enzima katalizuju ciklizaciju linearnog molekula likopena na jednom ili oba njegova kraja pri čemu se formiraju cikloheksanski prstenovi. Dodavanjem jednog ε-prstena molekulu likopena pomoću LCYE nastaje δ-karoten. Potom, δ-karoten podleže daljoj ciklizaciji, ali pošto LCYE ne može da koristi monociklične karotenoide kao supstrat, dodavanje drugog, β-prstena vrši LCYB i tada nastaje narandžasti pigment α-karoten



**Slika 1.** Shema biosinteze karotenoida sa glavnim mestima u biosintetskom putu gde se vršila metabolička modulacija biosinteze. Skraćenice enzima u biosintetskom putu: GGPS - geranilgeranil pirofosfat sintaza; PSY - fitoen sintaza; PDS - fitoen desaturaza, ZDS - ζ-karoten desaturaza; LCYB - likopen-β-ciklaza; LCYE - likopen-ε-ciklaza; CHYB - β-karoten hidroksilaza; CYP97C - citohrom P450 monooksigenaza 97C; VDE - violaksantin de-epoksidaza; ZEP - zeaksantin epoksidaza; CCS - kapsantin-kapsorubin sintaza; NXS - neoksantin sintaza; HBFD - karotenoid 4-hidroksi-β-ring 4-dehidrogenaza; CBFD - karotenoid β-ring 4-dehidrogenaza.

[18]. Ukoliko je likopen supstrat za LCYB, prvo dolazi do dodavanja jednog β-prstena i nastaje γ-karoten, a potom isti enzim dodaje i drugi β-prsten pri čemu nastaje narandžasti pigment β-karoten [5], odnosno provitamin A. Svi ovi karotenoidi koji se sastoje samo od ugljovodoničnog niza, uključujući i α- i β-karoten, nazivaju se karotenima.

U narednim koracima biosinteze karotenoida dejstvom hidroksilaza dolazi do dodavanja kiseonika cikličnim karotenima u vidu hidroksilnih grupa, kao i epoksidnih prstenova, dejstvom epoksidaza, gde nastaju ksantofili. Postoje dva različita tipa hidroksilaza: β-karoten-hidroksilaza (CHYB), koja hidroksiluje β-prsten cikličnog karotena, i citohrom P450 monooksigenaza 97C (CYP97C) koja hidroksiluje i β- i ε-prstene karotena. Hidroksilacijom α-karotena nastaje žuti pigment lutein koji predstavlja finalni produkt β,ε-grananja u biosintezi karotenoida [19]. Sa druge strane, narandžasti pigment β-karoten podleže hidroksilaciji pomoću CHYB pri čemu nastaje žuti zeaksantin koji pomoću enzima zeaksantin-epoksidaze (ZEP) prelazi u anteraksantin i violaksantin. Dejstvom violaksantin-de-epoksidaze (VDE), violaksantin se može konvertovati nazad u zeaksantin. Ove reakcije epoksidacije i de-epoksidacije, kao i zeaksantin, anteraksantin i violaksantin, koji u njima učestvuju, sastavni su deo ciklusa ksantofila [2]. Anteraksantin i violaksantin, aktivnošću enzima kapsantin-kapsorubin sintaze (CCS), mogu biti konvertovani u kapsantin i kapsorubin, glavne karotenoide koji daju karakterističnu narandžastu i crvenu boju [15,20]. Poslednji korak u biosintezi karotenoida jeste konverzija violaksantina u neoksantin pomoću neoksantin-sintaze (NXS).

Dok je sinteza karotenoida u listovima u čvrstoj koordinaciji sa sintezom hlorofila, a njihov sastav i količina izuzetno konzervirani u višim biljkama [21], karotenoidni profili cvetova mogu se drastično razlikovati među biljnim vrstama, pa čak i među varijetetima iste vrste. Tako, na primer, narandžasti cvetovi *Osmanthus fragrance* Lour. i *Calednula officinalis* cv. 'Alice orange' nastaju akumulacijom  $\beta$ - i  $\alpha$ - [22], odnosno  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -karotena [23], dok su u žutim cvetovima *Gentiana lutea* [24], *Dendranthema grandiflorum* [25], *Eustoma* ([26], *Ipomoea obscura* [27] i *Tagetes* [28] najčešći  $\beta$ , $\epsilon$ -ksantofili, od kojih su najprisutniji lutein i njegovi derivati. Istu boju daju i  $\beta$ , $\beta$ -ksantofili, pa se tako u cvetovima *Oncidium* [29] i *Ipomoea sp.* [27] u najvećoj količini akumulira violaksantin. Violaksantin i anteraksantin cvetovima *Lilium spp.* cv. 'Conneticut King' daju žutu boju, dok su cvetovi kultivara 'Saija', gde se pored anteraksantina akumulira i kapsantin, crvene boje [30]. Dva pigmenta sa kraja biosintetskog puta karotenioda, kapsantin i kapsorubin, odgovorni su za crvene cvetove *Lilium tigrinum* cv. 'Red Night' [31].

Neke biljke akumuliraju i jedinstvene karotenoide, koji se retko nalaze u cvetovima drugih vrsta. Roze cvetovi *Hybiscus syriacus* nastaju akumulacijom lutein-5,6-epoksida, auroksantina i hrizantemaksantina [32], dok su izrazito crveni cvetovi *Adonis aestivalis* i *A. annua*, posledica akumulacije velike količine astaksantina [33]. U kruničnim listićima kalifornijskog maka (*Eschscholzia califonica* Cham.) [34] i šafrana (*Crocus sativus*) [35] dominantno se akumulira krocetin, a u žigu tučka šafrana akumuliraju se apokarotenoidi, glikozidi krocetina i pirokrocina, koji im daju crvenu boju [36].

Takođe, značajna raznolikost karotenoidnih profila postoji i u plodovima biljaka. Plodovi paradajza (*Solanum lycopersicum*), na primer, imaju crvenu boju zahvaljujući likopenu koji čini 85% ukupnih karotenoida [37], dok su kapsantin i kapsorubin najzastupljeniji ksantofili u plodovima crvene paprike, *Capsicum annuum* [38]. Sa druge strane, boja korenova šargarepe (*Daucus carota*) i slatkog krompira (*Ipomoea batatas*) ili ploda dinje, rezultat je akumulacije velike količine  $\beta$ -karotena [39, 40].

## Regulacija biosinteze i degradacije karotenoida

Uprkos važnosti i brojnim funkcijama koje karotenoidi imaju u biljkama, regulacija njihove sinteze i akumulacije nije u potpunosti razjašnjena. Do sada je utvrđeno da akumulacija karotenoida u različitim biljnim organima generalno zavisi od brzine sinteze i degradacije koje su regulisane na transkripcionom i post-transkripcionom nivou [41]. Međutim, posebno u nefotosintetičkim tkivima, ovi mehanizmi su pod snažnim uticajem brojnih internih (senescencija, cirkadijalni ritam, epigenetski mehanizmi i ABA) i eksternih signala kao što su svetlost, temperatura ili abiotički stres, što čini složenu mrežu regulacije, o kojoj još uvek ne postoji kompletna slika.

Transkripciona regulacija predstavlja prvi i primarni kontrolni mehanizam karotenogeneze, i u cvetovima viši nivoi transkripata enzima biosinteze karotenoida povezani su sa većim sadržajem karotenoida [16,42]. Na primer, usled povećane ekspresije većine karotenogenih gena, posebno DXS i PSY, u narandžastim laticama nevena se akumulira mnogo veća količina ksantofila luteina nego u žutim [43], dok cvetovi azijskog ljiljana pokazuju veću ekspresiju gena biosinteze karotenoida u žutim ili narandžastim nego u belim cvetovima [27]. Biosinteza fitoena je početni korak koji određuje brzinu sinteze karotenoida i njihovu količinu [44]. Tako je u mladim cvetnim pupoljcima *Gentiana lutea* nivo ekspresije *psy* i *dxs* (1-deoksi-D-ksiluloza-5-fosfat) gena najniži, dok sa povećavanjem ekspresije ova dva gena tokom sazrevanja cvetova dolazi do sve veće akumulacije karotenoida [45]. I u plodovima paradajza, prilikom njihovog sazrevanja i promene boje iz zelene u crvenu, povećana sinteza likopena nastaje zahvaljujući povećanoj transkripciji uzvodnih gena njegove biosinteze, kao što su *psy*, *pds* i *crts* [46]. U narednim koracima, snižavanje ekspresije ili odsustvo nekog od nizvodnih gena dovodi do akumulacije uzvodnih produkata biosinteze i određuje tip

karotenoida u hromoplastima [47]. Kod paradajza likopen se akumulira zahvaljujući sniženoj transkripciji nizvodnih gena kao što su *lcyb*, *lcye* i *chy*, dok je kod *Osmanthus fragrans* velika količina  $\beta$ -karotena u cvetovima rezultat nižeg nivoa transkripcije nizvodnih *chyb* i *ze* gena [48]. Kod ploda paprike žuta i narandžasta boja rezultat su odsustva, odnosno snižene ekspresije *ccs* gena [49]. Pored toga, razlika u aktivnosti LCYB i LCYE, enzima koji se nalaze u tački grananja biosintetskog puta karotenoida, može da utiče na balans između  $\beta,\beta$ - i  $\beta,\epsilon$ -karotenoida [50]. U kruničnim listićima *Oncidium* visok procenat  $\beta,\beta$ -karotenoida povezan je sa većom ekspresijom *lcyb* u odnosu na *lcye* [51], dok je, nasuprot tome, u kruničnim listićima hrizanteme veća ekspresija *lcye* u odnosu na *lcyb* uzrok visokog procenta  $\beta,\epsilon$ -karotenoida [52].

Kod nekih biljnih vrsta boja cvetova određena je ne samo sintezom karotenoida, već i njihovom degradacijom. Među familijom karotenoid-dioksigenaza (CCD), koje su odgovorne za dobijanje apokarotenoida i omogućavaju produkciju ABA i strigolaktona [53], katalitička aktivnost CCD1 i CCD4 može imati ulogu u determinaciji obojenosti cvetova i plodova. Najpoznatiji primer je hrizantema gde je ekspresija karotenoidnih biosintetičkih gena u žutim i belim cvetovima gotovo jednaka, ali su sintetisani karotenidi degradovani aktivnošću CCD4 koji se eksprimira samo u belim cvetovima [54]. Isti tako, i kod *Lilium bownii* var. *colchesteri*, nakon cvetanja boja se za jedan dan promeni iz žute u belu, usled smanjenja količine karotenoida u cvetovima kao rezultat povećane ekspresije *CCD4* [55]. Aktivnost *CCD4* je zabeležena i kod krokusa [56], cvetova krompira [57], kao i vrsta roda *Brassica* [58]. Pored toga, integracija gena za enzime GGPS, PSY, LCYB i CHYB iz *I. obscura* var. *lutea* sa žutim cvetovima i prisustvo novosintetisanih pigmenata zeaksantina i neoksantina, u cvetovima transgenih biljaka *I. nil* doveli su do promene boje cveta iz bele u žutu boju tek sa utišavanjem *CCD4* gena [59,60]. *CCD1* takođe degraduje karotenoide i doprinosi emisiji važnih komponenti mirisa cvetova petunije i *Osmanthus fragrans* [22, 61]. Međutim korelacija između ekspresije *CCD1* i akumulacije karotenoida nije jasna i pretpostavlja se da se *CCD1* nalazi u citoplazmi i da ima ograničen pristup karotenoidima u hromoplastima [36].

Transkripcioni faktori imaju ključnu ulogu u aktivaciji ili supresiji gena biosintetskog puta karoteinoda i mnogobrojni signalni putevi u odgovoru na uticaj sredine ili programe razvića stapaju se na nivou ovih regulatora ekspresije gena [41,62]. U poslednjoj deceniji prilično veliki broj pretpostavljenih regulatora transkripcije biosinteze karotenoida identifikovan je kod raznih biljnih vrsta, karakterističnih za različite tipove tkiva. Međutim, dok je njihova uloga u regulaciji biosintetskog puta karotenoida u fotosintetičkim tkivima ili pri sazrevanju plodova paradajza i citrusa bar jednim delom dobro izučena, podaci o transkripcionim faktorima koji kontrolišu metabolizam karotenoida u cvetovima prilično su oskudni. Do danas su poznata samo tri regulatora specifična za cvetove (*COI1/MYB305*, *RCP1* i *RCP2*), ali se gotovo ništa ne zna o njihovim funkcionalnim mehanizmima. *COI1/MYB305* kod duvana reguliše akumulaciju  $\beta$ -karotena i cvetnog nektara, utičući na transkripcionu regulaciju *NtPSY*, *NtZDS* i *NtLCY* gena [63]. *RCP1* otkriven je kod *Mimulus lewisii* i funkcioniše kao pozitivni regulator svih gena u biosintezi karotenoida, ali pošto mesta njegovog vezivanja za DNK još uvek nisu utvrđena, nije jasno da li on ima direktan ili indirektan uticaj na ekspresiju. Pored toga, *RCP1* ograničava biosintezu antocijanina i samim tim reguliše sadržaj karotenoida i antocijanina u cvetovima *M. lewisii* [64]. Identifikovan u istoj biljci, i *RCP2* pokreće ekspresiju gena celokupnog biosintetskog puta karotenoida, ali vrlo verovatno na indirektan način, preko regulacije formiranja hromoplasta [65].

Post-transkripcioni i post-translacioni mehanizmi predstavljaju dodatni nivo kontrole i finog podešavanja akumulacije karotenoida. Post-transkripciona regulacija uključuje kontrolu splajsovanja, dok se post-translaciona regulacija odvija kroz mehanizme kao što su protein-protein interakcije, povratne petlje, promene redoks stanja i metaboličko kanalisanje kroz komplekse više enzima [62]. Primer post-transkripcione regulacije je alternativno spajanje PSY, što rezultira varijantama PSY enzima različitih aktivnosti [66, 67].

Protein-protein interakcije enzima karotenogenog puta sa šaperonima i Clp proteazama pomažu u održavanju njihove stabilnosti i proteostaze, što je dokumentovano za DXS i PSY, glavne litimirajuće enzime biosintetskog puta karotenoida [68], dok stvaranje enzimskih kompleksa, poput GGPPS-PSY ili fuzije enzima u formiranju astaksantina može efikasno kanalisati međuproizvodne metabolite i povećati stopu karotenogeneze [69,70].

## PROMENA BOJE CVETA PRIMENOM GENETIČKOG INŽENJERSTVA

U oblasti hortikulture, gde važan segment čine ukrasne biljne vrste, postoji stalna potreba za kultivarima sa izmenjenim karakteristikama, posebno sa novim bojama i drugačijim šarama cvetova. Sa razvojem biotehnoloije stvoreni su uslovi za manipulaciju genima u cilju promene ovih karakteristika, a koje se ne mogu postići klasičnim ukrštanjem ili mutagenozom [71,72]. U poslednjih 35 godina najčešće je modifikovan put biosinteze antocijanina, najrasprostranjenijih pigmenata u prirodi. Na ovaj način postignute su nove boje cvetova kod najmanje 50 ukrasnih vrsta, a transgene linije karanfila (*Dianthus caryophyllus*) i ruža (*Rosa x hybrida*) sa plavom ili ljubičastom bojom cvetova, mogu se naći i u komercijalnoj prodaji [73,74].

Međutim, manipulacija biosintetskog puta antocijanina suočena je i sa nekoliko prepreka. Osnovni problem je što antocijanini, pre nego što se uskladište u vakuolama, često prolaze kroz procese glikozilacija, acilacija i metilacija koje potencijalno mogu uticati na promenu boje [75]. Ove reakcije je veoma teško kontrolisati, što otežava usmeravanje sinteze u pravcu stvaranja određenog antocijanina. Pored toga, antocijanini menjaju boju pod uticajem različitih faktora poput pH vakuole [76], kopigmentacije [77], kompleksacije metalnim jonima [78] i veličine i oblika ćelije [79], pa akumulacija odgovarajuće vrste antocijanina ne garantuje i očekivanu obojenost cvetova. Iz ovih razloga u poslednjoj dekadi fokus istraživanja promene boje cveta proširen je i ka metaboličkim modifikacijama druge glavne grupe pigmenata, karotenoida (Tabela 1).

Gen	Vrsta	Poreklo gena	Novosintetisani pigment	Boja cveta (divlji tip)	Promenjena boja	Referenca
<i>crtW, crtZ</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Paracoccus</i>	Astaksantin	žuta	ružičasta	[81]
	<i>Nicotiana glauca</i>	<i>Brevundimonas sp.</i>	Ehinenon derivati, astaksantin	žuta	crvena	[83]
	<i>Ipomoea obscura</i>	<i>Brevundimonas sp.</i>	Kantaksantin, adonirubin, astaxantin,	bela	ružičasta	[84]
<i>crtW</i>	<i>Petunia sp.</i>	<i>A. aurantiacum</i>	Astaksantin	svetlo-žuta	narandžasta	[85]
	<i>Lotus japonicus</i>	<i>A. aurantiacum</i>	Astaksantin	žuta	narandžasta	[86]
<i>crtO</i>	<i>Nicotiana glauca</i>	<i>Cyanobacterium synechocistis</i>	Ketolutein, ehinenon derivati, 4-ketozeaksantin	žuta	žuta	[82]
	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Hematococcus pluvialis</i>	Astaksantin	žuta	crvena	[80]
<i>crtB</i>	<i>Iris germanica</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	Likopen	žuta	svetlo-crvena	[89]
	<i>Fortunella hindsii</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	Astaksantin	bela	narandžasta	[90]
<i>GGPP, PSY, LCYB, crt1</i>	<i>Ipomoea nil</i>	<i>Ipomoea obscura, Pantoea ananatis</i>	Zeaksantin, neoksantin	bela	bela	[59]
<i>XES</i>	<i>Petunia x hybrida</i>	<i>Ipomoea obscura, Tagetes erecta, Solanum lycopersicum</i>	Anteraksantin, zeaksantin, β-karoten, β-kriptoksantin	svetlo-žuta	nijanse narandžaste	[95]
<i>BCH</i>	<i>Oncidium</i>	supresija gena	Neoksantin, violaksantin	žuta	svetlo-žuta	[92]
<i>CCD4</i>	<i>Ch. morifolium</i>	supresija gena	-	žuta	bela	[36]
<i>CCS</i>	<i>Iris germanica</i>	<i>Lilium lancifolium</i>	Kapsantin, kapsorubin	žuta	nijanse crvene	[15]
	<i>S. lycopersicum</i>	<i>Lilium lancifolium</i>	Kapsantin, kapsantinu-sličan	žuta	narandžasta	[101]
	<i>Viola cornuta</i>	<i>Lilium lancifolium</i>	Kapsantin	žuta	narandžasta	[96]

Tabela 1. Spisak gena i biljnih vrsta na kojima je dobijena promena boje cvetova putem genetičke modulacije biosinteze karotenoida.

Prvi podaci o uspešnosti metaboličkog inženjeringa biosinteze karotenoida dobijeni su početkom ovog veka, genetičkom modifikacijom duvana, *Nicotiana tabacum*. Tada su Mann i saradnici [80] introdukcijom gena za  $\beta$ -karoten-ketolazu (*crtO*) iz zelene alge *Haematococcus pluvialis* dobili biljke koje su akumulirale nove  $\kappa$ -karotenoide, naročito astaksantin i to pre svega u nektarijama cvetova. Kao rezultat, blede žute nektarije postale su svetlo-crvene. Nekoliko godina kasnije, slične rezultate su dobili Ralley i saradnici [81] koji su postigli sintezu astaksantina koristeći dva gena, 3,3'- $\beta$ -hidroksilazu (*crtZ*) i 4,4'- $\beta$ -oksigenazu (*crtW*), iz morskih bakterija roda *Paracoccus*. Nasuprot tome, transformacija *N. glauca crtO* genom iz cijanobakterija, nije dovela do akumulacije astaksantina, već samo ketokarotenoida kao što su 4'-ketolutein, ehinenone 3'-hidroksiehinenon i 4-ketozeaksantin, koji predhode njegovoj sintezi [82]. Akumulacija astaksantina kod *N. glauca* postignuta je tek uvođenjem *crtW* i *crtZ* iz *Brevundimonas sp.* [83]. Ekspresijom ovih gena, endogeni karotenoidi kao što su  $\beta$ -karoten i zeaksantin, uspešno su konvertovani u keto-hidroksilne karotenoide, uključujući i astaksantin, što je osim promene boje cveta iz žute u crvenu, izmenilo i boju listova, koji su u fazi senescencije bili crveni. Slični rezultati su dobijeni nedavno i genetičkom transformacijom ladoleža sa belim cvetovima sa *crtW* i *crtZ* genima. Pokazano je da 16,5% ukupnih karotenoida u listovima pripada grupi novosintetisanih ketokarotenoida. Takođe, potvrđena je mogućnost nasleđivanja ovih osobina na potomke [84]. Iako je ovim istraživanjima potvrđena mogućnost promene boje cveta ili njegovih određenih delova putem modifikacije biosinteze karotenoida, njihov cilj je prvenstveno bio demonstracija potencijala ove metode za proizvodnju komercijalno i farmakološki značajnih ketokarotenoida, kao što su kantaksantin i posebno astaksantin, koji se u prirodi izuzetno retko akumuliraju u tkivima biljaka. Prva studija usmerena na dobijanje novih boja cvetova ukrasnih biljaka putem modifikacije biosinteze karotenoida bila je transformacija kultivara petunije sa blede-žutim cvetovima *crtW* genom poreklom iz *Agrobacterium aurantiacum* [85]. U transgenim biljkama sintetisan je astaksantin, a u zavisnosti od stepena njegove akumulacije, boja cvetova kretala se od tamno žute pa sve do narandžaste. Slično tome, Suzuki i saradnici [86] upotrebili su *crtW* da uvedu biosintezu astaksantina u *Lotus japonicus*. Transformisane biljke akumulirale su nekoliko novih karotenoida u cvetovima, uključujući i astaksantin, što je promenilo njihovu prirodno žutu boju u različite nijanse narandžaste.

Pored genetičkog inženjeringa sinteze astaksantina, još jedna strategija manipulacije biosinteze karotenoida može biti iskorišćena za promenu boje cvetova. To je ektopična ekspresija gena za fitoen sintazu (*psy* kod biljaka i *crtB* kod bakterija) u cilju povećanja ukupnog sadržaja karotenoida. Kao što je navedeno ranije, sinteza fitoena je kod mnogih vrsta limitirajući faktor sinteze karotenoida i nivo ekspresije PSY u direktnoj je korelaciji sa akumulacijom karotenoida. Ovaj pristup prethodno je upotrebljen u cilju povećanja sadržaja karotenoida kod plodova paradajza, krtola krompira, lišća duvana i semena nekoliko biljnih vrsta [87]. Najpoznatiji primer njegove uspešnosti je introdukcija gena biosintetskog puta  $\beta$ -karotena (provitamin A) u endosperm pirinča [88], koji je prirodno bele boje i ne sadrži karotenoide. Nasuprot tome, u semenima *psy-crtI* transgenog pirinča, pored povećanja nutritivne vrednosti, došlo je i do promene boje u zlatno-žutu (eng. „golden rice“). Ove studije pokazale su da pojačana ekspresija gena za PSY ili CRTB u biljkama može rezultirati povećanom pigmentacijom i potencijalno dovesti do dobijanja novih nijansi cvetova. Tako je ekspresija *crtB* gena poreklom iz *Pantoea agglomerans*, kod *Iris germanica* cv. 'Fire Bride' dovela do promene boje plodnika i cvetne drške iz zelene u narandžastu, kao i prašnika i bazanog dela segmenta listova iz bele u roze [89], a kod *Fortunella hindsii* Swingle za posledicu imala promenu boje cveta iz bele u narandžastu, kao i promenu boje korenova i opalih listova [90]. Sa druge strane, introdukcija 5 gena (za GGPS, PSY, LCYB i CHYB preklom iz *I. obscura* i bakterijskog *crtI*), uprkos sintezi pigmenta zeaksantina i neoksantina, nisu doveli do promene bele boje cvetova *Ipomoea nil* [59]. Ovaj izostanak promene boje potvrdio je da količina akumuliranih karotenoida ne zavisi samo od ekspresije gena koji učestvuju u njihovoj biosin-



tezi, već i degradacije, koja je prvenstveno pod kontrolom CCD4. Žuta boja cvetova *I. nil* dobijena je tek utišavanjem gena za CCD4 ciljanom mutagenезom pomoću CRISPR/Cas9 sistema, kada je količina karotenoida u kuničnim listovima povećana za 20 puta u odnosu na cvetove kontrolnih biljaka [60]. Isto tako, gotovo potpunom supresijom ekspresije CCD4 uvođenjem dve sekvence CmCCD4aRNAi, boja cvetova kod kultivara hrizantema 'Jimba' promenjena je iz bele u žutu [91]. Utišavanje gena, kao još jedna efikasna strategija modifikacije boje cvetova, primenjeno je i kod *Oncidium* 'Gower Ramsey'. Snižavanjem ekspresije gena za  $\beta$ -karoten hidroksilazu (BCH) putem RNK interferencije, boja cvetova ovog varijeteta orhideja promenjena je iz jarko žute u svetlo žutu boju, usled smanjenja količine neoksantina i violaksantina [92].

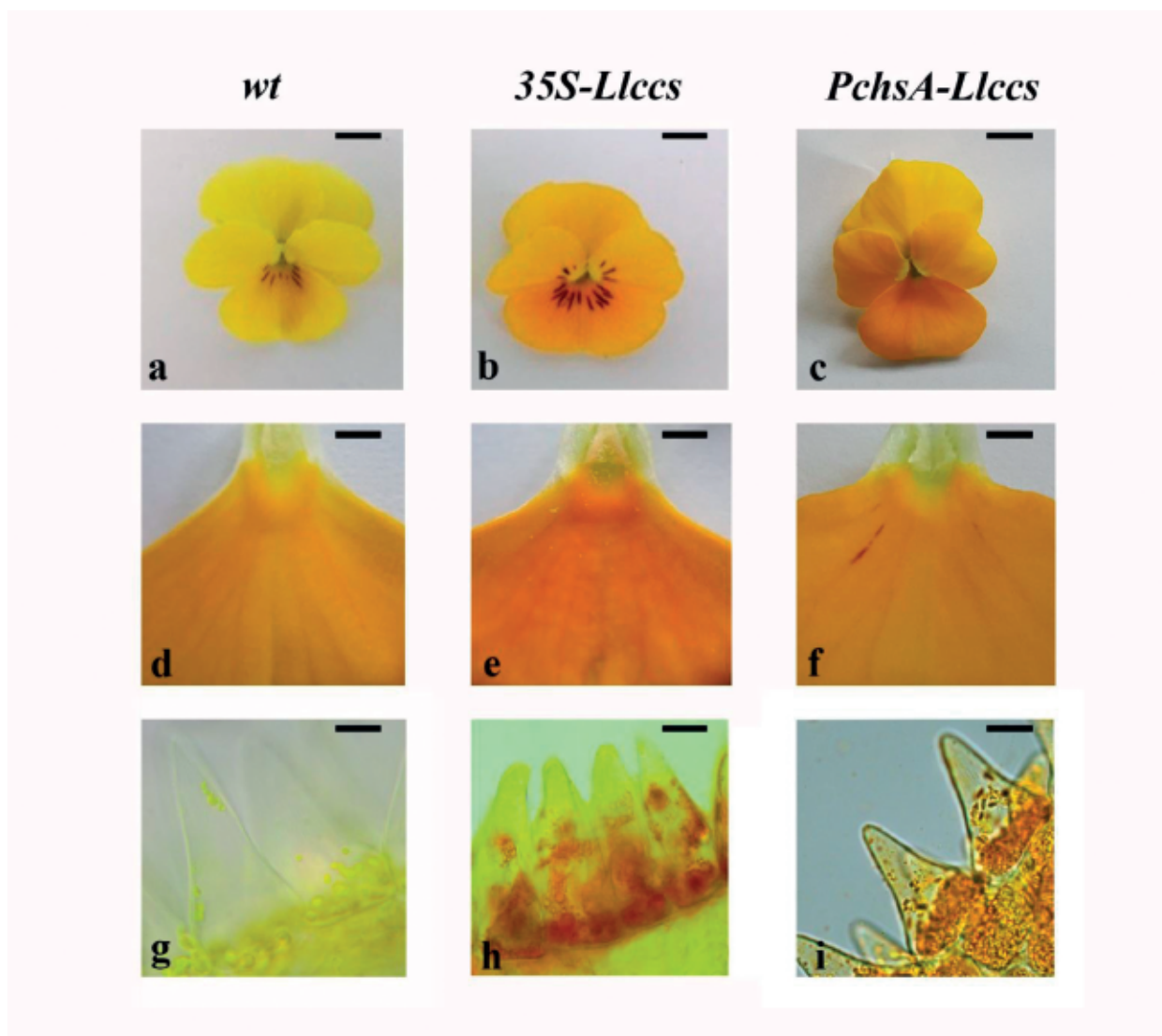
Još jedan važan faktor koji utiče na akumulaciju karotenoida, a čijom se manipulacijom može postići izmenjena boja cveta, jeste esterifikacija ksantofila. Enzim koji katalizuje ovaj proces, ksantofil esteraza (XES), prvobitno je indentifikovan analizom *pyp1* (PALE YELLOW PETAL 1) mutanata paradajza, čije cvetove karakterišu potpuno odsustvo estara ksantofila, smanjena količina ukupnih karotenoida i nepravilan razvoj hromoplasta [93]. Značaj esterifikacije ksantofila, takođe je potvrđen poređenjem svetlo žutih cvetova *Petunia hybrida* i tamno žutih cvetova njenog bliskog srodnika *Calibrachoa hybrida*, gde je pokazano da je nizak nivo XES i slab afinitet prema *trans*-ksantofilima ključni uzrok zbog koga cvetovi petunije nisu tamnije boje [94]. Štaviše, heterologna ekspresija XES poreklom iz žutih varijeteta paradajza, nevena ili *Ipomoea obscura* u transgenoj petuniji pospešila je esterifikaciju ksantofila, stvaranje karotenoid-lipoprotein vezujućih struktura u hromoplastima i uticala na ekspresiju endogenih gena biosinteze karotenoida - što je povećalo količinu akumuliranih karotenoida u laticama i dovelo do tamnije obojenosti cvetova [95].

I kao poslednji u nizu, gen za kapsantin-kapsorubin sintazu (*ccs*) pokazao se kao korisno oruđe u cilju promene boje cveta. Kapsantin-kapsorubin sintaza žute pigmente anteraksantin i violaksantin prevodi u pigmente koji daju crvenu boju, kapsantin i kapsorubin - dva ketoksantofila koji sadrže jedan, odnosno dva neuobičajena  $\kappa$ -prstena. To su glavni pigmenti crvene paprike i narandžastih ili crvenih cvetova nekoliko pripadnika *Lilium spp.*, a identifikovani su i kod nekoliko drugih vrsta kao što su *Aesculus* i *Berberis*. Spisak svih biljnih vrsta gde se sintetišu ovi pigmenti prikazan je u [96]. Do danas klonirani i funkcionalno okarakterisani su jedino *ccs* geni iz *C. annuum* [97] i *Lilium lancifolium* [98]. Efikasnost koriscenja *ccs* iz paprike pokazana je njegovom introdukcijom u *N. benthamiana* pomoću virusnog vektora, gde su listovi nakon transfekcije promenili boju usled sinteze i akumulacije kapsantina u hloroplastima [99]. Isto tako, heterologna ekspresija nekoliko gena biosintetskog puta karotenoida, uključujući *ccs* paprike, dovela je do akumulacije zeaksantina, astaksantina i kapsantina u endospermu pirinča [100]. Sa druge strane, funkcionalnost *ccs* gena iz *L. lancifolium* prvi put je pokazana u transgenom kalusu *Iris gerimanica*, gde je ekspresija *Llccs* pod kontrolom konstitutivnog CaMV 35S promotora dovela do značajne akumulacije kapsantina i kapsorubina, kao i promene boje iz žute u različite nijanse narandžasto-crvene [15].

Potencijal introdukcije, za cvet specifičnog, *Llccs* gena za modifikaciju biosinteze karotenoida pokazan je i kod dikotiledonih biljaka koje prirodno akumuliraju prekursore kapsantina i kapsorubina. Preusmeravanje biosinteze karotenoida prema kapsantinu i kapsantin-sličnom karotenoidu kroz ektopičnu ekspresiju *Llccs* gena pod kontrolom himernog promotora (E35S-PchsA), uspešno je primenjeno za promenu boje cveta paradajza i prvi je primer promene boje cveta bilo koje biljne vrste genetičkom modifikacijom biosinteze kapsantina [101]. Za razliku od žutih cvetova netransformisanih biljaka, cvetovi transformisanog paradajza bili su u različitim nijansama narandžaste boje, a novosintetisani pigmenti detektovani su ne samo u cvetovima već i u listovima transgenih biljaka.

Sitnocvetna ljubičica, *V. cornuta* L. je prva i za sada jedina ukrasna biljna vrsta kod koje je izmenjena boja cveta metaboličkim inženjeringom kapsantina [96]. U tu svrhu korišćeni su kultivari u čijim cvetovima,

koji su prirodno žute boje, dolazi do akumulacije velikih količina ksantofila, uključujući anteraksantin i violaksantin - koji su prekursori kapsantina i kaspurubina, ali prirodno ne dolazi do njihove biosinteze zbog nepostojanja *ccs* gena. Nakon uspostavljanja efikasnog protokola za *in vitro* regeneracije za ovu biljnu vrstu [102, 103], introdukcija i ekspresija *Llccs* pod kontrolom CaMV 35S dovela je do promene boje kruničnih listića cvetova iz žute u nijanse narandžaste boje (Slika 2 b, e, h). Pokazano je da je ova promena nastala usled akumulacije kapsantina, novosintetisanog pigmenta u hromoplastima transgenih biljaka, čija je količina bila proporcionalna nivou *Llccs* ekspresije [96]. Pored toga, istraživanja koja su u toku, pokazuju mnogo intenzivniju pigmentaciju hromoplasta pri ekspresiji *Llccs* pod kontrolom E35S-PchsA promotora - gde je pojačani 35S promotor fuzionisan sa promotorom gena za halkon sintazu (*chsA*) *Petunia hybrida*, koji usmerava cvet-specifičnu ekspresiju ovog gena - u odnosu na *Llccs* pod kontrolom konstitutivnog CaMV 35S (Slika 2 c, f, i). Ovo ukazuje da se povećanje sinteze kapsantina i/ili kaspurubina (kao i drugih karotenoida) radi postizanja intenzivnije obojenosti cvetova može postići pažljivim odabirom promotora, među kojima oni tkivno specifični mogu predstavljati najpodesnije kandidate.



**Slika 1.** Promena boje cvetova sitnocvetne ljubičice (*Viola cornuta*) nastala usled ektopijske ekspresije gena za kapsantin-kaspurubin sintazu poreklom iz cvetova ljiljana. (a) Cvet netransformisane biljke, wt-divlji tip; (b, c) Cvetovi transformisanih ljubičica dobijenih posle genetičkih transformacija pod kontrolom 35S (b) i 35S-PchsA promotora (c); (d) Detalj donjeg kruničnog listića netransformisane biljke i (e, f) Cvetovi transformisanih ljubičica dobijenih posle genetičkih transformacija pod kontrolom 35S (e) i 35S-PchsA promotora (f); (g) Čelije abaksijalne strane kruničnih listića netransformisane biljke i (h, i) transformisanih ljubičica dobijenih posle genetičkih transformacija pod kontrolom 35S (h) i 35S-PchsA promotora (i) gde se može uočiti akumulacija novosintetisanog pigmenta u hromoplastima. Barovi: a-c, 10 mm; d-f, 1 mm; g-i, 10  $\mu$ m.

Na kraju, mora se posebno naglasiti, da se samo kod malog broja biljnih vrsta prirodno sintetišu kapsantin i/ili kapsorubin [96,104]. Prirodni izvori hrane koji sadrže ova dva  $\kappa$ -ksantofila gotovo da su ograničeni na plodove paprike i njihove produkte. Zbog značaja za zdravlje, kao što su snažna aktivnost uklanjanja aktiviranog kiseonika i inhibicija peroksidacije lipida slobodnim radikalima [105] kao i potencijalna antitumorska aktivnost, kapsantin i kapsorubin su odlična ciljna grupa za genetički inženjering različitih biljnih vrsta kao izvora za proizvodnju ovih metabolita, kao i poljoprivrednih kultura u cilju poboljšanja njihove nutritivne vrednosti.

## ZAKLJUČAK

Promena boje cveta metaboličkim inženjeringom biosintetskog puta karotenoida je relativno novo i do sada nedovoljno istraženo polje biotehnologije ukrasnih biljaka. Iako su genetičke manipulacije karotenogeneze koje prvenstveno nisu bile usmerene na promenu pigmentacije, potvrdile mogućnost promene boje cveta kako uvođenjem novih, tako i povećanom ekspresijom ili utišavanjem postojećih gena, ona je do sada dokumentovana za svega nekoliko ornamentalnih vrsta. Pored toga, najjednostavnija manipulacija biosintezom karotenida pomoću jednog gena najčešće ne dovodi do intenzivne promene u akumulaciji karotenoida (a time i intenzivne promene obojenosti cvetova). Povećanje njene efikasnosti, gotovo izvesno, zahteva introdukciju više gena i njihovu ekspresiju na jedan koordinisani način, što u metaboličkom inženjeringu biljaka predstavlja poseban izazov.

Geni i enzimi u biosintetskom putu karotenoida opsežno su proučavani poslednjih 20 godina, međutim, regulacija, skladištenje i degradacija karotenoida u biljkama, a posebno u cvetovima, ostaje da se u potpunosti razjasni. Iako su istraživanja na klasičnim model-sistem biljkama, poput arabidopsisa, duvana ili paradajza, pružila osnovna znanja o različitim aspektima metabolizama i regulacije karotenoida, za nekoliko regulatornih gena i enzima, a posebno veliki broj faktora transkripcije, pokazalo se da snažno utiču na biosintezu i akumulaciju karotenoida kao odgovor na metaboličke, razvojne i sredinske signale. Poznavanje njihovog mehanizma delovanja i manipulacija ovim faktorima može biti ključna za dugoročni uspeh u metaboličkom inženjeringu biosintetskog puta karotenoida.

## Zahvalnica

Ovaj rad je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, ugovor broj 451-03-68/2022-14-200007.

## Literatura

1. Brockington SF, Yang Y, Gandia-Herrero F, Covshoff S, Hibberd JM, Sage RF et al. Lineage-specific gene radiations underline the evolution of novel betalain pigmentation in caryophyllales. *New Phytologist* 2015; 207: 1170-80.
2. Yuan H, Zhang J, Nageswaran D, Li L. Carotenoid metabolism and regulation in horticultural crops. *Horticulture Research* 2015; 2: 15036.
3. Domonkos I, Kis M, Gombos Z, Ughy B. Carotenoids, versatile components of oxygenic photosynthesis. *Progress in Lipid Research* 2013; 52: 539-61.
4. Hirschberg J. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current Opinion in Plant Biology* 2010; 4: 210-18.
5. Zhu C, Bai C, Sanahuja G, Yuan D, Farré G, Naqvu S et al. The regulation of carotenoid pigmentation in flowers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2010; 504: 132-141.
6. Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, Peuch-Pagès V, Dun EA, Pillot JP et al. Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* 2008; 455: 189-94.
7. Walter MH, Strack D. Carotenoids and their cleavage products: biosynthesis and functions. *Natural Product Reports* 2011; 28: 663-92.
8. Fraser PD, Bramley PM. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research* 2004; 43: 228-65.
9. Fiedor J, Burda K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients* 2014; 6: 466-88.
10. Waters M, Pyke K. Plastid development and differentiation. In: Møller SG (ed), Blackwell Publishing Ltd, Oxford. *Plastids* 2005; 13: 30-59.
11. Horner HT, Healy RA, Ren G, Fritz D, Klyne A, Seames C, Thornburg RW. Amyloplast to chromoplast conversion in developing ornamental tobacco floral nectaries provides sugar for nectar and antioxidants for protection. *American Journal of Botany* 2007; 94: 12-24.
12. Bian W, Barsan C, Egea I, Purgatto E, Chervin C, Zouine M et al. Metabolic and molecular events occurring during chromoplast biogenesis. *Journal of Botany* 2011; 289859.
13. Cunningham FX, Gantt E. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 1998; 49: 557-83.
14. Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal* 2008; 54: 733-49.
15. Jeknić Z, Morré JT, Jeknić S, Jevremović S, Subotić A, Chen THH. Cloning and functional characterization of a gene for capsanthin-capsorubin synthase from Tiger Lily (*Lilium lancifolium* Thunb. 'Splendens'). *Plant Cell Physiology* 2012; 53: 1899-912.
16. Ohmiya A. Qualitative and quantitative control of carotenoid accumulation in flower petals. *Scientia Horticulturae* 2013; 163: 10-9.
17. Isaacson T, Ohad I, Beyer P, Hirschberg J. Analyses *in vitro* of the enzyme CRTISO establishes a poly-cis-carotenoid biosynthesis pathway in plants. *Plant Physiology* 2004; 136: 4246-55.
18. Cunningham FX, Gantt E. One ring or two? Determination of ring number in carotenoids by lycopene  $\epsilon$ -cyclases. *Proc. of the National Academy of Sciences of the USA* 2001; 98: 2905-10.
19. Nisar N, Li L, Shan I, Khin NC, Pogson BJ. Carotenoid metabolism in plants. *Molecular Plant* 2015; 8: 68-82.
20. Guzman I, Hamby S, Romero J, Bosland PW, O'Connell MA. Variability of carotenoid biosynthesis in orange colored *Capsicum spp.* *Plant Science* 2010; 179: 49-59.
21. Meier S, Tzfadia O, Vallabhaneni R, Gehring C, Wurtzel E. T. A transcriptional analysis of carotenoid, chlorophyll and plastidial isoprenoid biosynthesis genes during development and osmotic stress responses in *Arabidopsis thaliana*. 2011; *BMC Syst. Biol.* 5 (1), 77.
22. Baldermann S, Kato M, Kurosawa M, Kurobayashi Y, Fujita A, Fleischmann P. et al. Functional characterization of a carotenoid cleavage dioxygenase 1 and its relation to the carotenoid accumulation and volatile emission during the floral development of *Osmanthus fragrance* Lour. *Journal of Experimental Botany* 2010; 61: 2967-2977.
23. Kishimoto S, Maoka T, Sumitomo K, Ohmiya A. Analysis of carotenoid composition in petals of calendula (*Calendula officinalis* L.). *Bioscience, biotechnology and biochemistry* 2005; 65: 2781-2787.

24. Zhu C, Yamamura S, Nishihara M, Koiwa H, Sandmann G. cDNAs for the synthesis of cyclic carotenoids in petals of *Gentiana lutea* and their regulation during flower development. *Biochimica et Biophysica Acta* 2003; 1625: 305-308.
25. Kishimoto S, Maoka T, Nakayama M, Ohmiya A. Carotenoid composition in petals of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura). *Phytochemistry* 2004; 65: 2781-2787.
26. Nakayama M, Miyasaka M, Maoka T, Yagi M, Fukuta N. A carotenoid-derived yellow Eustoma screened under blue and ultraviolet lights. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 2006; 75: 161-165.
27. Yamamizo C, Kishimoto S, Ohmiya A. Carotenoid composition and carotenogenic gene expression during *Ipomoea* petal development. *Journal of Experimental Botany* 2010; 61: 709-719.
28. Park YJ, Park SY, Arasu VA, Al-Dhabi NA, Ahn HG, Kim JK et al. Accumulation of carotenoids and metabolic profiling in different cultivars of *Tagetes* flowers. *Molecules* 2017; 22: 313.
29. Hieber AD, Mudalige-Jayawickrama RG, Kuehnle AR. Color genes in the orchid *Oncidium Gower Ramsey*: identification, expression, and potential genetic instability in an interspecific cross. *Planta* 2006; 223: 521-531.
30. Yamagishi M, Kishimoto S, Nakayama M. Carotenoid composition and changes in expression of carotenoid biosynthetic genes in tepals of Asiatic hybrid lily. *Plant Breeding* 2010; 129: 100-107.
31. Marki-Fisher E, Eugster CH. Das carotenoid spektrum der antheren und petalen von *Lilium tigrinum* cv. 'Red Night'. *Helvetica Chimica Acta* 1985; 68: 1708-1715.
32. Hanny BW, Henson RD, Thompson AC, Gueldner RC, Hedin PA. Identification of carotenoid constituents in *Hybiscus syriacus*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 1972; 20: 914-916.
33. Cunnungham FX, Gantt E. A study in scarlet: enzymes of ketocarotenoid biosynthesis in the flowers of *Adonis aestivalis*. *Plant Journal* 2005; 41: 478-492.
34. Wakelin AM, Lister CE, Conner AJ. Inheritance and biochemistry of pollen pigmentation in California poppy (*Eschscholzia californica* Cham.) *International Journal of Plant Science* 2003; 164: 867-875.
35. Frusciantè S, Diretto G, Bruno M, Ferrante P, Pietrella M, Prado-Cabrero A et al. Novel carotenoid cleavage dioxygenase catalyzes the first dedicated step in saffron crocin biosynthesis. *Proc. of National Academy of Science of the USA* 2014; 111: 12246-12251.
36. Ohmiya A, Kato M, Shimada T, Nashima K, Kishimoto S, Nagata M. Molecular basis of carotenoid accumulation in horticultural crops. *The Horticulture Journal* 2019; 88: 135-149.
37. Tadmor Y, King S, Levi A, Davis A, Meir A, Wasserman B et al. Comparative fruit colouration in watermelon and tomato. *Food Research International* 2005; 38: 837-841.
38. Kim JS, An CG, Park JS, Lim YP, Kim S. Carotenoid profiling from 27 types of paprika (*Capsicum annuum* L.) with different colors, shapes and cultivation methods. *Food Chemistry* 2016; 201: 64-71.
39. Yuan H, Zhang J, Nageswaran D, Li L. Carotenoid metabolism and regulation in horticultural crops. *Horticulture Research* 2015; 2: 15036.
40. Burri BJ. Evaluating sweet potato as an intervention food to prevent vitamin A deficiency. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2011; 10: 118-130.
41. Stanley L, Yuan YW. Transcriptional regulation of carotenoid biosynthesis in plants: So many regulators, so little consensus. *Frontiers in Plant Science* 2019; 10, 1017.
42. Shilpa P, Ravishankar KV, Shivashankara KS, Sadashiva AT, Kumar NS. Molecular mechanisms involved in biosynthesis and regulation of carotenoids in plants. *Journal for Horticultural Science* 2017; 11: 91-103.
43. Moehs CP, Tian L, Osteryoung KW, Della Penna D. Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development. *Plant Molecular Biology* 2001; 45: 281-293.
44. Sun T, Yuan H, Cao H, Yazdani M, Tadmor Y, Li L. Carotenoid metabolism in plants: the role of plastids. *Molecular Plant* 2018; 11: 58-74.
45. Zhu C, Yamamura S, Koiwa H, Nishihara M, Sandmann G. cDNA cloning and expression of carotenogenic genes during flower development in *Gentiana lutea*. *Plant Molecular Biology* 2002; 48: 277-285.
46. Yuan H, Zhang J, Nageswaran D, Li L. Carotenoid metabolism and regulation in horticultural crops. *Horticulture Research* 2015; 2: 15036.
47. Galpaz N, Burger Y, Lavee T, Tzuri G, Sherman A, Melamed T, et al. Genetic and chemical characterization of an EMS induced in *Cucumis melo* CRTISO gene. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2013; 539: 117-125.

48. Han Y, Wang X, Chen W, Dong M, Yuan W, Liu X et al. Differential expression of carotenoid-related genes determines diversified carotenoid coloration in flower petal of *Osmanthus fragrans*. *Tree Genetics and Genomes* 2014; 10: 329-338.
49. Rodriguez-Uribe L, Guzman I, Rajapakse W, Richins RD, O'Connell MA. Carotenoid accumulation in orange-pigmented *Capsicum annuum* fruit, regulated at multiple levels. *Journal of Experimental Botany* 2012; 63: 517-526.
50. Harjes CE, Rocheford TR, Bai L, Brutnell TP, Kandianis CB, Sowinski SG et al. Natural genetic variations in lycopene epsilon cyclase tapped for maize biofortification. *Science* 2008; 319: 330-333.
51. Chiou CY, Pan HA, Chuang YN, Yeh KW. Differential expression of carotenoid-related genes determines diversified carotenoid coloration in floral tissues of *Oncidium* cultivars. *Planta* 2010; 232: 937-948.
52. Kishimoto S, Ohmiya A. Regulation of carotenoid biosynthesis in petals and leaves of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.). *Physiologia Plantarum* 2006; 128: 437-447.
53. Ibdah M, Azulay Y, Portnoy V, Wasseerman B, Bar E, Meir A. et al. Functional characterization of CmCCD1, a carotenoid cleavage dioxygenase from melon. *Phytochemistry* 2006; 67: 1579-1589.
54. Ohmiya A, Kishimoto S, Aida R, Yoshioka S, Sumimoto K. Carotenoid cleavage dioxygenase (CmCCD4) contributes to white color formation in chrysanthemum petals. *Plant Physiology* 2006; 142: 1193-1201.
55. Hai NTL, Masuda J, Miyajima I, Thien NQ, Mojtahedi N, Hiramatsu M et al. Involvement of carotenoid cleavage dioxygenase 4 gene in tepal color change in *Lilium brownii* var. *colchesteri*. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 2012; 81: 366-373.
56. Rubio-Moraga A, Ahrazem O, Rambla JL, Granell A, Gómez-Gómez L. Crocins with high levels of sugar conjugation contribute to the yellow colours of early-spring flowering crocus tepals. *PLoS ONE* 2013; 8: e71946.
57. Campbell R, Ducreux LJ, Morris WL, Morris JA, Suttle JC, Ramsay G. et al. The metabolic and developmental roles of carotenoid cleavage dioxygenase 4 from potato. *Plant Physiology* 2010; 154: 656-664.
58. Zhang B, Liu C, Wang Y, Yao X, Wang F, Wu J et al. Disruption of a carotenoid cleavage dioxygenase 4 gene converts flower color from white to yellow in *Brassica* species. *New Phytologist* 2015; 206: 1513-1526.
59. Watanabe K, Oda-Yamamizo C, Sage-Ono K, Ohmiya A, Ono M. Overexpression of carotenogenic genes in the Japanese morning glory *Ipomoea (Pharbitis) nil*. *Plant Biotechnology* 2017; 34: 177-85.
60. Watanabe K, Oda-Yamamizo C, Sage-Ono K, Ohmiya A, Ono M. Alteration of flower colour in *Ipomoea nil* through CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of carotenoid cleavage dioxygenase 4. *Transgenic Research* 2018; 27: 25-38.
61. Simkin AJ, Underwood BA, Aldridge M, Loucas HM, Shibuya K, Schmelz E. et al. Circadian regulation of the PhCCD1 carotenoid cleavage dioxygenase controls emission of  $\beta$ -ionone, a fragrance volatile of petunia flowers. *Plant Physiology* 2004; 136: 3504-3514.
62. Sun T, Li L. Toward the 'golden' era: the status in uncovering the regulatory control of carotenoid accumulation in plants. *Plant Science* 2020; 290:110331
63. Wang W, Liu G, Niu H, Timko MP, Zhang H. The F-box protein CO11 functions upstream of MYB305 to regulate primary carbohydrate metabolism in tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. TN90). *Journal of Experimental Botany* 2014; 65 (8): 2147-2160.
64. Sagawa JM, Stanley LE, la Fountain AM, Frank HA, Liu C, Yuan YW. An R2R3-MYB transcription factor regulates carotenoid pigmentation in *Mimulus lewisii* flowers. *New Phytologist* 2016; 209: 1049-1057.
65. Stanley, L. E., Ding, B., Sun, W., Mou, F., Hill, C., Chen, S., et al. A tetratricopeptide repeat protein regulates carotenoid biosynthesis and chromoplast development in monkeyflowers (*Mimulus*). *Biorxiv* 2017;171249.
66. Ahrazem O, Diretto G, Argandoña J, Fiore A, Rubio Moraga A, Rial C., et al. The specialised roles in carotenogenesis and apocarotenogenesis of the phytoene synthase gene family in saffron. *Frontiers in Plant Science* 2019; 10:249.
67. Chen L, Li W, Li Y, Feng X, Du K, Wang G. et al. Identified trans-splicing of YELLOW-FRUITED TOMATO 2 encoding the PHYTOENE SYNTHASE 1 protein alters fruit color by map-based cloning, functional complementation and RACE. *Plant Molecular Biology* 2019; 100:647-658.
68. Pulido P, Llamas E, Llorente B, Ventura S, Wright, LP, Rodríguez-Concepción M. Specific Hsp100c haperones determine the fate of the first enzyme of the plastidial isoprenoid pathway for either refolding or degradation by the stromal Clp protease in Arabidopsis. *PLoS Genet* 2016; 12: e1005824.

69. Camagna, M., Grundmann, A., Bär, C., Koschmieder, J., Beyer, P., Welsch, R. 2019. Enzyme fusion removes competition for geranylgeranyl diphosphate in carotenogenesis. *Plant Physiol*, 179: 1013–1027.
70. Nogueira M, Enfissi EM, Welsch R, Beyer P, Zurbriggen MD, Fraser PD, Construction of a fusion enzyme for astaxanthin formation and its characterisation in microbial and plant hosts: a new tool for engineering ketocarotenoids. *Metabolic Engineering* 2019; 52: 243–252
71. Azadi P, Bagheri H, Nalouisi AM, Nazari F, Chandler SF. Current status and biotechnological advances in genetic engineering of ornamental plants. *Biotechnology Advances* 2016; 34: 1073-1090.
72. Noman A, Aqeel M, Deng J, Khalid N, Sanoullah T, Shuilin H. Biotechnological advancements for improving floral attributes in ornamental plants. *Frontiers in Plant Science* 2017; 8: 530.
73. Holton TA. Transgenic plants exhibiting altered flower color and methods for producing same. Patent Publication number 1996; WO/96/36716.
74. Katsumoto Y, Fukuchi-Mizutani M, Fukui Y, Brugliera F, Holton TA, Karan M. Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hues flowers accumulating delphinidin. *Plant Cell Physiology* 2007; 48: 1589-1699.
75. Tanaka Y, Brugliera F, Kalc G, Senior M, Dyson B, Nakamura N. et al. Flower color modification by engineering of the flavonoid biosynthetic pathway: practical perspectives. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2010; 74: 1760-1769.
76. Yoshida K, Miki N, Momonoi K, Kawachi M, Katou K, Okazaki Y. et al. Synchrony between flower opening and petal-color change from red to blue in morning glory, *Ipomoea tricolor* cv. Heavenly Blue. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 2009; 85: 187–197.
77. Takeda K, Fujii A, Senda Y, Iwashina T. Greenish blue flower colour of *Strongyloodon macrobotrys*. *Biochem. Syst. Ecol.* 2010; 38: 630–633.
78. Momonoi K, Yoshida K, Mano S, Takahashi H, Nakamori C, Shoji K et al. A vacuolar iron transporter in tulip, TgVit1, is responsible for blue coloration in petal cells through iron accumulation. *Plant Journal* 2009; 59: 437–447.
79. Dyer AG, Whitney HM, Arnold S.J, Glover BJ, Chittka L. Mutations perturbing petal cell shape and anthocyanin synthesis influence bumblebee perception of *Antirrhinum majus* flower colour. *Arthropod-Plant Inte* 2007; 1: 45–55.
80. Mann V, Harker M, Pecker I, Hirschberg J. Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers. *Nature Biotechnology* 2000; 18: 888-92.
81. Ralley L, Enfissi EMA, Misawa N, Schuch W, Bramley PM, Fraser PD. Metabolic engineering of ketocarotenoid formation in higher plants. *Plant Journal* 2004; 39: 477-86.
82. Zhu C, Gerjets T, Sandmann G. *Nicotiana glauca* engineered for the production of ketocarotenoids in flowers and leaves by expressing the cyanobacterial *crtO* ketolase gene. *Transgenic Research* 2007; 16(6): 813-21.
83. Mortimer CL, Misawa N, Perez-Fons L, Robertson FP, Harada H, Bramley PM et al. The formation and sequestration of nonendogenous ketocarotenoids in transgenic *Nicotiana glauca*. *Plant Physiology* 2017; 173: 1617-35.
84. Otani M, Kitayama K, Ishikuro H, Hattan J, Maoka T, Harada H et al. Construction of transgenic *Ipomea obscura* that exhibits new reddish leaf and flower colors due to introduction of  $\beta$ -carotene ketolase and hydroxylase genes. *Plant Biotechnology* 2021; 38, 219-226.
85. Umemoto N, Takano M, Shimada H, Mamiya K, Toguri T. Flower color modification by xanthophyll biosynthetic genes in petunia. *Plant Cell Physiology Suppl.* 2006; S110.
86. Suzuki S, Nishihara M, Nakatsuka T, Misawa N, Ogiwara I, Yamamura S. Flower color alteration in *Lotus japonicus* by modification of the carotenoid biosynthetic pathway. *Plant Cell Reports* 2007; 26: 951-9.
87. Rosati C, Diretto G, Giuliano G. Biosynthesis and engineering of carotenoids and apocarotenoids in plants: state of the art and future prospects. *Biotechnol. Genet. Eng.* 2009; 26: 151-174.
88. Ye X, Al-Babili S, Klöti A, Zhang J, Lucca P, Beyer P et al. Engineering the provitamin A ( $\beta$ -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 2000; 287: 303–305.
89. Jeknić Z, Jeknić S, Jevremović S, Subotić A, Chen TH. Alteration of flower color in *Iris germanica* L. 'Fire Bride' through ectopic expression of phytoene synthase gene (*crtB*) from *Pantoea agglomerans*. *Plant Cell Reports* 2014; 33: 1307-21.
90. Cao H, Wang J, Dong X, Han Y, Ma Q, Ding Y et al. Carotenoid accumulation affects redox status, starch metabolism, and flavonoid/anthocyanin accumulation in citrus. *BCM Plant Biology* 2015; 15: 27.

91. Ohmiya A, Sumitomo K, Aida R. "Yellow Jimba": Suppression of carotenoid cleavage dioxygenase (CmCCD4a) expression turns white chrysanthemum petals yellow. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 2009; 78: 450-455.
92. Wang HM, To KY, Lai HM, Jen ST. Modification of flower colour by suppressing  $\beta$ -ring carotene hydroxylase in *Oncidium*. *Plant Biol.* 2016; 18, 220–229.
93. Ariizumi T, Kishimoto S, Kakami R, Maoka T, Hirakawa H, Suzuki Y et al. Identification of the carotenoid modifying gene PALE YELLOW PETAL 1 as essential factor in xanthophyll esterification and yellow flower pigmentation in tomato (*Solanum lycopersicum*). *The Plant Journal: for cell and molecular biology* 2014; 79: 453-465.
94. Kishimoto S, Oda-Yamamizo C, Ohmiya A. Comparison of petunia and calibrachoa in carotenoid pigmentation of corollas. *Breeding Science* 2019; 69: 117-26.
95. Kishimoto S, Oda-Yamamizo C, Ohmiya A. Heterologous expression of xanthophyll esterase genes affects carotenoid accumulation in petunia corollas. *Scientific Reports* 2020; 10, 1299.
96. Trajković M, Jevremović S, Dragičević M, Simonović AD, Subotić AR, Milošević S et al. Alteration of flower color in *Viola cornuta* cv. "Lutea Splendens" through metabolic engineering of capsanthin/apsorubin synthesis. *Horticulturae* 2021; 7(9): 324.
97. Bouvier F, Hugueney P, d'Harlingue A, Kuntz M, Camara B. Xanthophyll biosynthesis in chromoplasts: isolation and molecular cloning of an enzyme catalyzing the conversion of 5,6-epoxycarotenoid into ketocarotenoid. *Plant Journal* 1994; 6: 45–54.
98. Jeknić Z, Morré JT, Jeknić S, Jevremović S, Subotić A, Chen THH. Cloning and functional characterization of a gene for capsanthin-capsorubin synthase from Tiger Lily (*Lilium lancifolium* Thunb. 'Splendens'). *Plant Cell Physiology* 2012; 53: 1899-912.
99. Kumagai MH, Keller Y, Bouvier F, Clry D, Camara B. Functional integration of non-native carotenoids into chloroplasts by viral-derived expression of capsanthin–capsorubin synthase in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Journal* 1998; 14: 305–315.
100. Ha SH, Kim JK, Jeong YS, You MK, Lim, SH, Kim JK. Stepwise pathway engineering to the biosynthesis of zeaxanthin, astaxanthin and capsanthin in rice endosperm. *Metab. Eng.* 2019; 52: 178–189.
101. Jeknić S. Alteration of flower color in *Solanum lycopersicum* through ectopic expression of a gene for capsanthin-capsorubin synthase from *Lilium lancifolium*. Bachelor's Thesis, Oregon State University, Corvallis, OR, USA, 2015; pp. 1–37.
102. Antonić D, Trajković M, Cingel A, Subotić A, Jevremović S. Plant regeneration from *in vitro*-derived leaf and petiole explants of *Viola cornuta* L. 'Lutea Splendens'. *Propagation of Ornamental Plants* 2017; 17: 95–102.
103. Trajković M, Antonić D, Cingel A, Ghalawenji N, Subotić A, Jevremović S. Advancement in protocol for *in vitro* seed germination, plant regeneration and cryopreservation of *Viola cornuta*. *3 Biotech* 2019; 9: 17.
104. Deli J, Matus Z, Tóth G. Carotenoid composition in the fruits of *Asparagus officinalis*. *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48: 2793–2796.
105. Maoka T, Goto Y, Isobe K, Fujiwara Y, Hashimoto K, Mochida K. Antioxidative activity of capsorubin and related compounds from paprika (*Capsicum annuum*). *J. Oleo. Sci.* 2001; 50: 663–665.